动 物 学 研 究 1999, Jun. 20 (3): 230~234　　CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

大鳞副泥鳅雄核发育单倍体胚胎发育的研究*

STUDY ON THE DEVELOPMENT OF ANDROGENETIC HAPLOID OF *Paramisgurnus dabryanus*

关键词 大鳞副泥鳅，雄核发育单倍体，胚胎发育
Key words *Paramisgurnus dabryanus*, Androgenetic haploid, Embryonic development
中图分类号 Q959.468

雄核发育(androgenesis)系指卵子只依靠雄性原核进行发育的生殖方式。尽管已有川鲽(*Platichthys flesus*)(Purdom, 1969)、马苏大麻哈鱼(*Oncohychus masou*)(Arai 等, 1979)、虹鳟(*Salmo gairdneri*)(Scheerer 等, 1991)、红点溪鳟(*Sulvelinnus fontinalis*)(May 等, 1995)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(Grunina 等, 1990)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(Meyers, 1995)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)(Masaka 等, 1995)和斑马鱼(*Danio rerio*)(Corley-Smith 等, 1996)等人工诱导雄核发育的报道，但对其单倍体胚胎发育的时序以及单倍体的形态与正常二倍体的区别等均未见报道。本文就该内容进行研究，以期提供可参考的资料。

1 材料与方法

1.1 材料鱼的选择和人工催产 泥鳅(*Misgurnus anguillicau*)和大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)来源于武汉市汤逊湖区，染色体分别为 2n = 100 和 2n = 48(余先觉等, 1989)，两种亲本的体重为 40~150 g，体长 10~20 cm。根据两种鱼的典型特征区别种类和雌雄，催产时采用 HCG 一次性肌肉注射进行人工催产，剂量：雌鱼 600~1 500 IU/尾，雄鱼减半，杀雄鱼后取出精巢，并将精巢分成若干等长的小段，待用。

1.2 泥鳅雌性原核的灭活 实验前，分别在直径为 9 cm 的培养皿中倒入合成卵巢液(Epler 等, 1984) 22 mL，卵巢液深度约为 3.5 mm，每个培养皿中分别放入 600~850 粒泥鳅卵子，在 30 W 紫外灭菌灯下(照距 20 cm)分别照射 10、20、40、60、90、120、180 s，总辐射剂量分别为 20、40、80、120、180、240、360 mJ/cm^2，边照射边摇动培养皿，各组卵子按相应的辐射剂量辐射后取出，倾掉保存液后立即与大鳞副泥鳅精子受精，同时设立反交组和对照组，将受精卵转入直径为 16 cm 的培养皿中控温[(23±1)℃]孵化；每 3 h 换水一次。

在胚胎发育过程中用显微镜观察各辐射剂量组卵子发育状况，并同步活体摄影，记录雄核发育单倍体胚胎发育状况、发育速度，比较对照组与受辐射组的发育区别，并在囊胚期和尾芽期进行染色体制片。

2 结 果

大鳞副泥鳅的未受精卵和正常受精卵的特征与梁秩燊等（1988）描述的特征一致。本结果中只列出 22 个发育时期，其中二倍体（2n）为大鳞副泥鳅（♀）×大鳞副泥鳅（♂）的后代，单倍体（1n）为泥鳅（♀）（雌核已灭活）×大鳞副泥鳅（♂）的雄核发育单倍体，大鳞副泥鳅雄核发育单倍体和二倍体各期的主要特征见表 1、图 1~30。

在胚胎发育过程中，随着辐射剂量的升高，鱼卵表面会出现陨石坑一样的凹痕（图 7，15→示）这一凹痕的出现明显来自紫外线对鱼卵的辐射。

单倍体胚胎发育与正常二倍体相比、原肠晚期之前，各期的形态特征并无太大区别，但在发育速度上有较大区别。从受精后至多细胞期二者发育速度一致、达高囊胚期时，单倍体发育开始滞后，从原肠期开始，单倍体发育速度比二倍体约慢一个发育期。在原肠期停留时间最长，胚层下包速度很慢，神经胚期以后，各期分期比较困难。自尾芽期，单倍体综合症开始明显化，最早症状是头小、身体小、躯干短而阔，尾短小，头、躯干、尾三者比例失常（图 17），肌肉效应期，单倍体鱼苗活动较弱，畸形严重的甚至见不到肌肉效应现象。

孵化期 90% 以上的单倍体胚胎身长只有二倍体孵化期身长的 2/3，而且有两类单倍体鱼苗（图 21，24），如果辐射剂量升高，畸形严重的鱼苗（图 22，23）比例增加。鳔一室期时，二倍体鱼苗体形正常，上唇有一对须须，鳃盖盖住第 4 对鳃丝，但俯视仍可见大部分鳃丝外露；鳔一室，充气；胸鳍迅速增大，基部有半弧状黑色素；血液循环系统完善，各器官分化明显。相比之下，雄核发育单倍体鱼

* 国家自然科学基金（No.39770592）和湖北省自然科学基金资助项目
本文 1998-09-14 收到，1999-01-04 修回

苗呈畸形，具有典型的单倍体综合症：头小、眼小，尾部短而弯曲，显微镜下可见围心腔扩大、腹水、水肿，心脏与血管系统发育不全，血液循环微弱且不完善，出膜后最长存活时间为 108 h。距受精后 144 h，单倍体 1/3 死亡，而正常二倍体鱼苗已发育至鳔一室期，鱼苗已具平游能力。

经染色体制片表明，86% 胚胎的染色体数为 24（图 29），该染色体数正好为雄鱼染色体（2n = 48）的一半，证明这部分胚胎为雄核发育单倍体胚胎；有 14% 的胚胎染色体数介于 24 和 74 之间（图 30），为嵌合体胚胎，这主要是由于部分卵子的染色体灭活不彻底造成的。

3 讨 论

有关鱼类雄核发育单倍体胚胎发育的研究未曾见有报道。本研究发现，大鳞副泥鳅雄核发育单倍体从高囊胚期开始，胚胎发育出现异常，主要表现在原肠下包运动发生阻滞，具较大的胚孔，胚胎发育速度明显减慢，而且，随

表 1 大鳞副泥鳅二倍体和雄核发育单倍体胚胎发育的比较 [(23±1)℃]

Table 1 A comparison of diploid and haploid embryonic development of *P. dabryanus*

发育期 (developing phase)	距受精后时间（时、分）(time of post-fertilization)		单倍体主要特征 (the major characteristics of haploid)	二倍体主要特征 (the major characteristics of diploid)	单倍体图号 (haploid Fig. No.)
	1n	2n			
胚盘隆起 (blastodisc stage)	0.37′	0.37′	胚盘隆起	胚盘隆起	1
2 细胞期 (2 - cell stage)	1.03′	1.03′	纵裂为 2 个细胞	纵裂为 2 个细胞	2
4 细胞期 (4 - cell stage)	1.35′	1.35′	纵裂为两排共 4 个细胞	纵裂为两排共 4 个细胞	3
8 细胞期 (8 - cell stage)	1.54′	1.54′	两排共 8 个细胞	两排共 8 个细胞	4
16 细胞期 (16 - cell stage)	2.07′	2.07′	4 排共 16 个细胞	4 排共 16 个细胞	
32 细胞期 (32 - cell stage)	2.33′	2.33′	4 排共 32 个细胞	4 排共 32 个细胞	5
64 细胞期 (64 - cell stage)	2.48′	2.48′	8 排共 64 个细胞	8 排共 64 个细胞	
多细胞期 (poly-cell stage)	4.26′	4.26′	细胞较多不易计数	细胞较多不易计数	
高囊胚期 (early blastula stage)	5.50′	5.30′	囊胚层隆起达最高	囊胚层隆起达最高	6
囊胚晚期 (late blastula stage)	7.30′	6.30′	细胞极小，囊胚层低偏	细胞极小，囊胚层低偏	7
原肠中期 (mid gastrula stage)	10.10′	8.40′	胚层下包 3/6～4/6	胚层下包 3/6～4/6	8
原肠晚期 (late gastrula stage)	12.20′	9.40′	下包 4/6～5/6	下包 4/6～5/6	9
神经胚期 (neural plate stage)	14.20′	12.36′	下包 5/6 后，卵黄栓不易内收	下包 5/6 后，余卵黄栓、胚头部已具雏形	10
胚孔封闭期 (closure of blastopore stage)	15.30′	14.10′	部分卵黄难以内收	卵黄内收，胚孔封闭，胚体头部隆起（图 11）	
肌节出现期 (myotome formation stage)	17.20′	15.05′	肌节出现，模糊不清	头部增大，肌节出现	12
眼囊期 (optic vesicle stage)	20.50′	17.35′	眼囊呈扁豆形	眼囊呈扁豆形（14）	13
嗅板期 (olfactory placode stage)	26.21′	21.05′	眼前方出现嗅板	眼前方出现嗅板（图 16）	15
眼晶体形成期 (lens formation stage)	29.36′	26.35′	眼中央出现晶体	卵黄深内凹，眼中央出现晶体（图 18）	17
肌肉效应期 (muscular effect stage)	35.51′	32.10′	肌肉微抽动，尾短小	肌肉抽动，尾部正常（图 20）	19
孵出期 (hatching stage)	46.0′	42.50′	膜自行溶解，苗孵出，围心腔扩大，尾弯短小	尾部弹破卵膜先行伸出，体正常，皱膜裹缠胚体（图 25～26）	21～22 23～24
眼黑色素期 (melanoid eye stage)	107.0′	94.0′	眼密布黑色素，围心腔更大	眼密布黑色素，头部色素增多，肌体上下各一行黑色素（图 $27_{下}$）	$27_{上}$ 28
鳔一室期 (one chamber air bladder stage)	死亡	144.0′	水肿，发白，开始死亡	鳔充气，一室，鱼苗可平游	

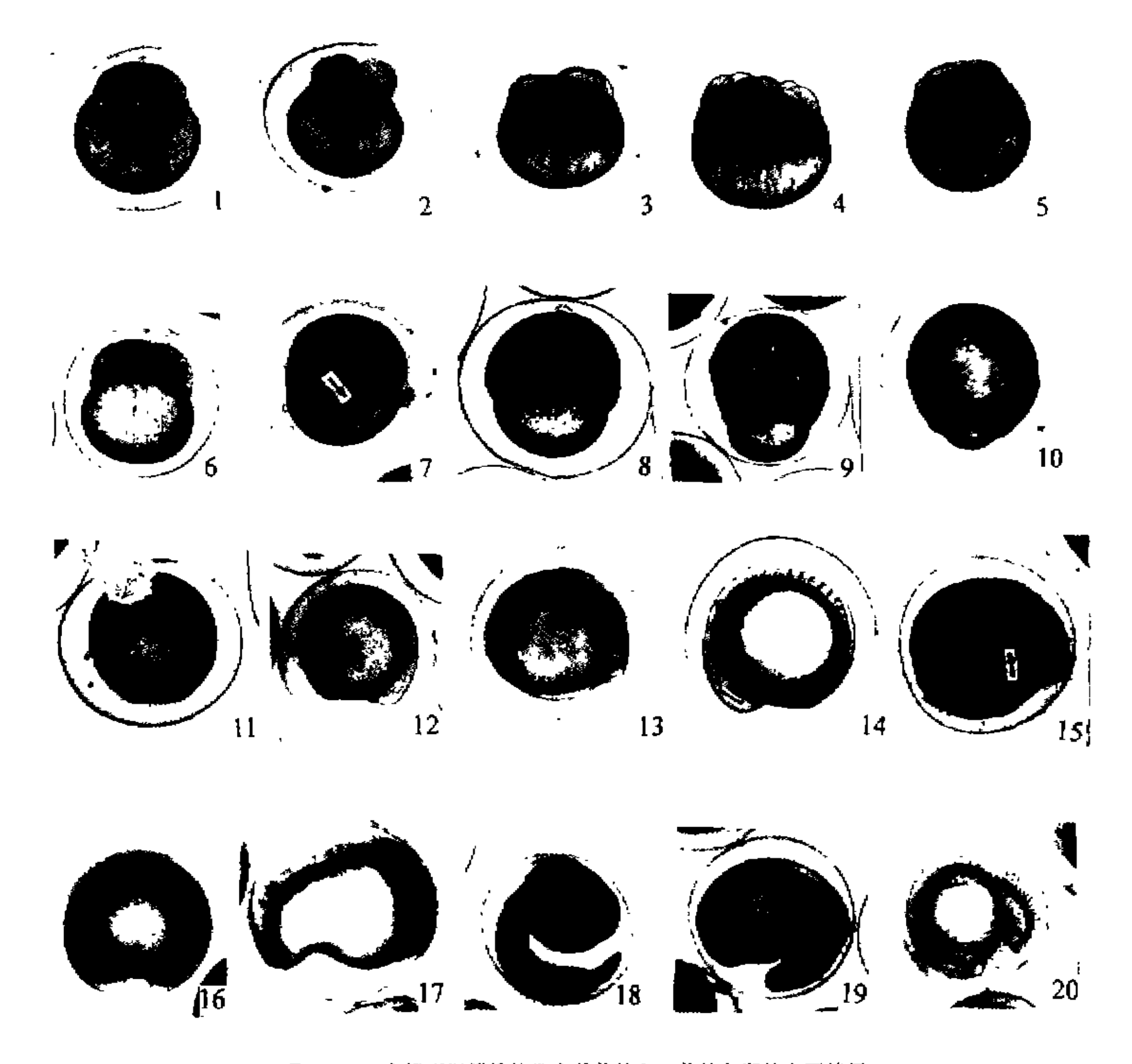


图 1～20 大鳞副泥鳅雄核发育单倍体和二倍体各期的主要特征

Figs. 1－20 Characteristics of haploid and diploid embryonic development of *P. dabryanus*

1. 胚盘隆起期(blastodisc stage)；2. 2细胞期(2－cell stage)；3. 4细胞期(4－cell stage)；4. 8细胞期(8－cell stage)；5. 32细胞期(32－cell stage)；6. 高囊胚期(early blastual stage)；7. 囊胚晚期(late blastula stage)；8. 原肠中期(mid gastrula stage)；9. 原肠晚期(late gastrula stage)；10. 神经胚期(neural plate stage)；11. 二倍体胚孔封闭期(closure of blastopore stage)；12. 肌节出现期(myotome formation stage)；13. 眼囊期(optic vesicle stage)；14. 二倍体眼囊期(optic vesicle stage of diploid)；15. 嗅板期(olfactory placode stage)；16. 二倍体嗅板期(olfactory placode stage of diploid)；17、18. 肌肉效应期(muscular effect stage)；19. 泥鳅二倍体肌肉效应期(muscular effect stage of *M. Anguillicaudatus*)；20. 大鳞副泥鳅二倍体肌肉效应期(muscular effect stage of *P. dabryanus*)。

着单倍体的继续发育，所表现出来的畸形症状愈来愈明显。过了神经胚后，单倍体与二倍体的差别更加明显。自尾芽期，单倍体综合症开始明显化，最典型的症状是头小、身体小、躯干短而阔、尾短小，头、躯干、尾三者比例失常。孵化期，大部分单倍体胚体的长只有二倍体长的2/3。胚后发育的单倍体只表现尾鳍循环和背部脊椎上下的循环，就单倍体的症状而言，其结果与张梅芬等（1993）研究泥鳅雌核发育单倍体症状相一致，也与两栖类中所观察到的单倍体综合症相类似(吴仲庆,1985;Gurdon,1960;Hamilton,1963)。由此说明，不同发育类型的单倍体所表现的畸形特征具有共同性。其主要症状为：头小、体短、尾上翘、水肿、围心腔扩大及循环系统发育不正常等，即所谓的单倍体综合症（haploid syndrome）。

就发育速度而言，张梅芬等（1993）在研究泥鳅雌核发育单倍体时发现，泥鳅雌核发育单倍体在可区分的发育时期（眼黑色素期）前的发育速度与同龄的二倍体无明显差异，许多组织或器官的形成，如肌节、耳石、心脏等的发生几乎与二倍体同时发生。本研究则发现，大鳞副泥鳅雄核发育单倍体的发育从高囊胚起要比正常二倍体慢一个发育期，与张梅芬等（1993）研究泥鳅雌核生殖单倍体的结果有所不同，而与两栖类雌核发育单倍体的胚胎发育结果相似（吴仲庆，1988；Porter，1939）。许多学者发现，两栖类雌核发育单倍体的胚胎发育从原肠期起便出现滞后现象。这种发育的差异可能是由于所研究的材料及发育方式不同造成的。

无论是雄核发育单倍体还是雌核发育单倍体均表现出

胚胎发育异常。Esper（1965）认为其发生的可能原因是不正常的核质比所造成的；但张梅芬等（1993）所测的二倍体和单倍体的核质比是一样的，并证实单倍体综合症并非核质比率不正常所造成。单套染色体组不能完全行使胚胎发育过程所需的正常遗传功能的结论是许多学者所公认的。

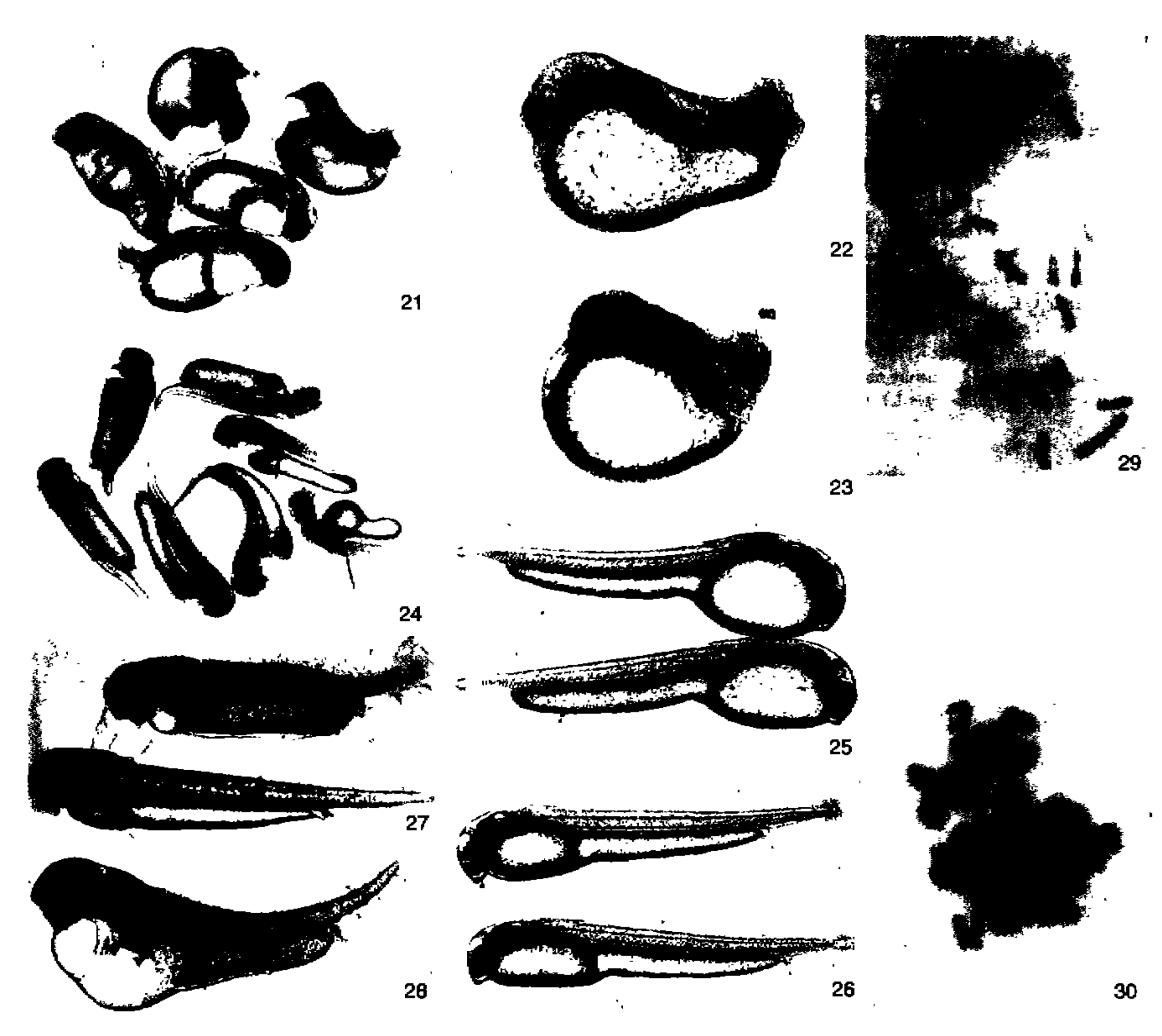


图 21～30　大鳞副泥鳅雌核发育单倍体和二倍体各期的主要特征

Figs. 21－30　Characteristics of haploid and diploid embryonic development of *P. dabryanus*

21、22、23. 孵出期畸形严重的单倍体鱼苗(the serious deformed haploid fry at hatching stage)；24. 孵出期畸形不太严重的单倍体鱼苗(the not serious deformed haploid fry at hatching stage)；25. 孵出期泥鳅二倍体(the diploid of *M. anguillicaudatus* at hatching stage)；26. 孵出期大鳞副泥鳅二倍体(the diploid of *P. dabryanus* at hatching stage)；27. 眼黑色素期单倍体(上)和二倍体(下)[the haploid (up) and diploid (down) at melanoid eye stage]；28. 眼黑色素期单倍体(the haploid at melanoid eye stage)；29. 大鳞副泥鳅单倍体染色体 n＝24(haploid chromosomes of *P. dabryanus* n＝24)；30. 嵌合体胚胎染色体(the chromosomes of mosaic embryo)。

参 考 文 献

吴仲庆，1985. 单套染色体组在泽蛙雌核单倍体发育中的作用. 动物学报，**31**(1)：28～32. [Wu Z Q, 1985. The role of a single genome in the development of the gynogenetic haploid of *Rana limnocharis*. *Acta Zoologica Sinica*, **31**(1)：28－32.]

吴仲庆，1988. 泽蛙雌核生殖单倍体发育中的核质关系. 动物学研究，**9**(4)：335～341. [Wu Z Q, 1988. Relations between nuclear and cytoplasm in the development of gynogenetic haploid of *Rana limnocharis*. *Zoological Research*, **9**(4)：335－341.]

余先觉,周 暾,李渝成等,1989.中国淡水鱼类染色体.北京:科学出版社.105~106,135~143.(Yu X J,Zhou T,Li Y C,1989.Chromosomes of Chinese fresh-water fishes. Beijing: Science Press. 105-106,135-143.)

张梅芬,吴美锡,丁汉波,1993 泥鳅雌核生殖单倍体胚胎发育的研究.动物学研究,14(4):361~366[Zhang M F,Wu M X,Ding H B,1993. Study on the development of gynogenesis haploid of *Misgurnus anguillicaudatus*. *Zoological Research*,14(4):361-366.]

梁秩燊,梁坚永,陈 钢等,1988.大鳞副泥鳅的胚胎发育及鱼种培养.水生生物学报,12(1):27~41.[Liang Z X,Liang J Y,Chen C *et al*,1988. The embryonic development and fingerling culture of loach, *Paramisgurnus dabryanus* Sauvage. *Acta Hydrobiological Sinica*,12(1):27-41.]

Arai K,Onozato H,Yamazaki F,1979. Artificial androgenesis induced with gamma irradiation in masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Bull Fac. Fish. Hokkaido Univ*.,30(3):181-186.

Corley-Smith G E,Lim G L,Brandhorst B P,1996. Production of androgenetic zebra fish (*Danio rerio*). *Genetics*,142:1265-1278.

Epler P,Orman M,Bieniarz K,1984. Attempt at determination of the origin of ovaran fluid in nature rainbow trout (*Salmon gairdneri* R) and carp (*Cyprinus carpio* L). *Pol. Arch. Hydrobiol*.,31(4):393-401.

Esper H,1965. Ribonuclei acid in haploid and diploid embryos of *Rana pipiens*. *J. Morph*.,111:227-238.

Gurdon J B,1960. The effect of ultraviolet irradiation on uncleaved eggs of *Xenopus laevis* Quart. *J. Microsc. Sci*.,101:299-311.

Hamilton L,1963. An experimental analysis of the development of the haploid syndrome in embryos of *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Expt. Morph*.,16:559-568.

Masaka T,Arai K,Suzuki R,1995. Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* form UV irradiated eggs by suppression of the first cleavage. *Fish. Sci*.,61(4):716-717.

May B,Henley K J,Krueger C C *et al*,1988. Androgenesis as a mechanism for chromosome set manipulation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*,75:57-70.

Parsons L E,Thorgard G H,1984. Induced androgenesis in rainbow trout. *J. Exp. Zool*.,231:407-412.

Purdom C E,1969. Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish. *Heredity*,24:431-444.

Scheerer P D,Thorgaard G H,Allendorf F W,1991. Genetic analysis of androgenetic rainbow trout. *J. Exp. Zool*.,260:382-390.

赵振山[①] 吴清江[②] 高贵琴[①] 黄 峰[①]
ZHAO Zhen-shan WU Qing-jiang GAO Gui-qin HUANG Feng
(①华中农业大学水产学院 武汉 430070)
(①*Fisheries College, Huazhong Agricultural University Wuhan* 430070)
(②中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)
(②*Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences Wuhan* 430072)